JNK通路对M2巨噬细胞极化及其肿瘤效应的影响

郝瑾[1]，朱子鑫[2]，吕小岩[3]，周钦[1,*]

（1.重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点试验室，重庆 400016;2.重庆市第八中学，重庆 400016;3.华西医院皮肤科，成都 610000）

摘要：该研究探究了 JNK 通路对 M2 巨噬细胞极化及 M2 介导的促肿瘤效应的影响。构建单核细胞 THP1 来源 M2 巨噬细胞模型(THP1-M2)，将细胞分为 4 组：用 PMA 诱导的未活化巨噬细胞组(M0)，用 PMA，IL-4 处理及阴性干扰（DMSO）的 M2 型巨噬细胞组(M2)，用特异性抑制剂阻断 JNK 通路的M2 型巨噬细胞组(M2-JNK I)。实时荧光定量PCR检测M2 表型marker基因的表达；免疫蛋白印迹法检测 M2 表型 marker 蛋白水平；细胞划痕试验检测巨噬细胞迁移能力；流式细胞数检测 7860 及 OSRC2 凋亡。结果与 THP1-M2 组相比，阻断 JNK 通路的 M2 组 M2 表型 marker 表达明显下降，同时其细胞迁移能力也呈下降趋势。且阻断 JNK 通路后，M2 巨噬细胞抑制肾癌细胞凋亡的能力减弱。该研究结果表明，抑制 JNK 通路后，M2 巨噬细胞极化状态受损，其促肿瘤效应可转变为抗肿瘤效应。

关键词：JNK 通路；M2 极化；肿瘤；IL-4

Effects of JNK Pathway on Polarization and Pro-tumor Function of M2 Macrophage

HAO Jin[1], ZHU Zi-xin[2], LV Xiao-yan[3], ZHOU Qin[1,*]

(1.Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Education Ministry，College of Laboratory Medicine，Chongqing Medical University，Chongqing 400016，China；2. Chongqing No.8 Secondary School，Chongqing 400016, China；3. Department of Dermatology, West China Hospital, Chengdu 610000, China)

Abstract: The present study investigates the effect of JNK pathway on the polarization of M2 status as well as pro-tumor function mediated by M2. THP1 derived M2 macrophage (THP1-M2) model was established. The cells were divided into 3 groups: the PMA

国家自然科学基金(批准号: 31401191)资助的课题
*通讯作者。Tel: 023-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31401191)
*Corresponding author. Tel: +86-23-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn

pretreated unpolarized macrophage (M0), the PMA and IL-4 induced M2 macrophage with DMSO (negative control) treated (M2), the JNK inhibitor treated M2 macrophage (M2-JNK I). Furthermore, the M2 associated markers Arginase1 （Arg1）, mannose receptor C-type 1 （Mrc1）were analyzed by Q-PCR, the protein level of Arg1 and Mrc1 were detected by Western blot, the migration ability of macrophages was tested by Wound Healing, the apoptosis of 786O and OSRC2 were analyzed by flow cytometry. Compared with the THP1-M2, THP1-M2-JNK I group showed decreased expression of Arg1 and Mrc1, and migration ability was impaired. What's more, block of JNK pathway inhibited the pro-tumor function of M2 on 786O and OSCR2. Taken together, our results suggest that inhibition of JNK pathway regulates M2 polarization and its pro-tumor effects.

Key words: JNK pathway; M2 polarization; tumor; IL-4

巨噬细胞具有高度的异质性,不同微环境可诱导其向两种相反的方向发生极化 [1]。巨噬细胞极化状态包括杀伤肿瘤的经典激活型(M1)巨噬细胞,和促进肿瘤的替代激活型(M2)巨噬细胞 [2]。不同极化状态的巨噬细胞参与调节体内稳态,伤口愈合,和肿瘤发生发展 [3]。白细胞介素 4(interleuki4，IL-4)可将 M0 型巨噬细胞诱导成 M2 型，以高表达精氨酸酶 1(Arginase1，Arg1)、甘露糖受体 C1 (mannose receptor C-type 1，Mrc1)等抗炎相关因子为表型特征，在肿瘤免疫方面发挥促进肿瘤发生发展的功能；γ-干扰素(interferonγ，IFN-γ)和脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)可诱导巨噬细胞极化为表型相反的 M1 型[4-6]。

涉及 M2 型巨噬细胞极化的机制也有很多，之前的研究大多集中于信号传导及转录激活因子 6（Signal transducers and activators of transcription，STAT-6）通路和磷脂酰肌醇激酶 3（phosphatei-dylinositol 3 kinase ，PI3K）通路等[4, 7, 8]。本课题组在之前的研究中首次探究了 c－Jun 氨基末端激酶(c－Jun N－terminal Kinase, JNK)通路对鼠源型巨噬细胞极化的调控作用及机制[9]。然而对于人源性 THP-1 来源巨噬细胞，JNK 通路对 M2 巨噬细胞极化标志物(Arg1，Mrc1) 的作用如何，对与 M2 型细胞相关转录因子（c-Myc，pparg）的作用如何还未曾报道。因此，本文主要研究 JNK 通路对调节人源巨噬细胞极化和 M2 型巨噬细胞促进癌症的影响，为进一步研究提供基础。

1　材料和方法

1.1 主要材料与试剂

细胞系：人单核巨噬细胞系 THP1、人肾透明腺癌细胞系 7860 和人肾细胞癌细胞系 OSRC2 (ATCC)。主要试剂：RPMI1640 培养基、胎牛血清、Trizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司)、逆转录试剂、蛋白质定量试剂盒、山羊抗鼠荧光二抗购自 Thermo 公司。UltraSYBR Mixture Real-time PCR 试剂购自 CWBIO 公司。鼠抗 Arg1mAb(1:2000, Proteintech, 66129-1-Ig)，鼠抗 Mrc1mAb (1:2000, Proteintech, 60143-1-Ig) ， 鼠 抗 β -ACTIN (1:4000,Proteintech, 60008-1-Ig)。佛波酯(phorbol-2-myristate-13-acetate，PMA)试剂购自碧云天公司。IL-4 (214-14)购自 Peprotech 公司。JNK 通路特异性抑制剂（JNK I）试剂购自 abcam。PCR 引物购自上海生工公司。

1.2 细胞培养

THP1 单核细胞,7860 和 OSRC2 肾癌细胞用含有 10%胎牛血清和 1%的青链霉素的 RPMI164 培养基, 在 37 ° C、5%二氧化碳的孵箱中培养。

1.3 建立 THP1-M0/M2 细胞模型

参照参考文献方法，建立巨噬细胞极化模型[10, 11]。离心收集悬浮 THP1 细胞，以 8 × 105 /孔接种于 6 孔板中，避光加入 5 ng /mL PMA，37° C 培养 24h，建立未活化型 THP1-M0 细胞；在 THP1-M0 细胞的基础上，换掉含 PMA 培养基，加入 20 ng / mL IL-4 诱导 16 h，得到 THP1-M2 细胞。用实时定量 PCR、ELISA 检测相关细胞因子及流式细胞术 western blot 检测巨噬细胞表型标志物的表达，鉴定 THP1-M2 模型。

1.4 实时荧光定量 PCR

收集细胞，弃去培养基，用 1×PBS 洗 3 次，加入 Trizol 提取总 RNA，取 1μg 反转录为 cDNA, 18S 作为内参, 实时定量 PCR 检测各组细胞中目的基因 mRNA 水平, 反应条件参照 Real-time PCR 试剂盒[UltraSYBR Mixture(TaKaRa 公司)]说明书。各引物见表 1。

表 1 引物列表

Table 1 The list of the primers

基因名称 Gene name	引物序列（5’→3’） Primer sequence	产物长度（bp） Product Size
18S	正向：GTAACCCGTTGAACCCCATT	151
	反向：CCATCCAATCGGTAGTAGCG	
Arg1	正向：TCACCTGAGCTTTGATGTCG	133
	反向：TGAAAGGAGCCCTGTCTTGT	
Mrc1	正向：TGATTACGAGCAGTGGAAGC	126
	反向：GTTCACCGTAAGCCCAATTT	

1.5 免疫印迹

离心收集细胞，1×PBS 洗 3 次，提取总蛋白，按照 BCA 试剂盒说明书，检测蛋白浓度，进行电泳，电转至 PCDF 膜，5%脱脂牛奶封闭 2h，一抗 4 °C 孵育过夜，二抗常温孵育 2 h，再进行化学发光显像。以β-actin 为内参，检测各组中 Arg1，Mrc1 的表达情况。

1.6 细胞划痕实验

在 6 孔板底外用记号笔画 3 条间隔为 0.5cm 的水平直线，将浓度为 5×10^5/mL 的细胞悬液接种于 6 孔板中，2mL/孔，待细胞长至 90%融合状态。弃去孔内完全培养基，无血清培养基饥饿处理 4h 后，用 10μL 微量移液器枪尖在细胞板上划垂直于水平线的划痕，PBS 洗 3 次，分别加入含不同处理物的无血清培养基放入 37℃、5% CO2 培养箱中培养。以划痕后时刻为 0h，在 0、12h 分别在各水平直线标记处跟踪拍摄各孔细胞划痕状态，每孔拍摄 9 个视野。使用显微镜(ECLIPSE Ti-s, Nikon,Tokyo, Japan)进行拍摄，运用 NIH Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)计算相对迁移率。

1.7 流式细胞术

收集阻断或未阻断 JNK 通路的 M2 型巨噬细胞上清作为条件培养基(conditioned medium，CM)，并设置对照组，共分为以下 3 组：M0 型巨噬细胞组(CM-M0)；阻断 JNK 通路的 M2 型巨噬细胞(CM-M2-JNKI)；阴性阻断的 M2 型巨噬细胞组(CM-M2)。将细胞接种于 6cm 板，分别用各组 CM 培养 48h 后，用，用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化，离心收集细胞，1×PBS 清洗 3 次后，400 μL PBS

重悬细胞。每组中加入适量 Annexin V FITC 和 PI，避光室温孵育 15 min，立即进行流式细胞凋亡检测。

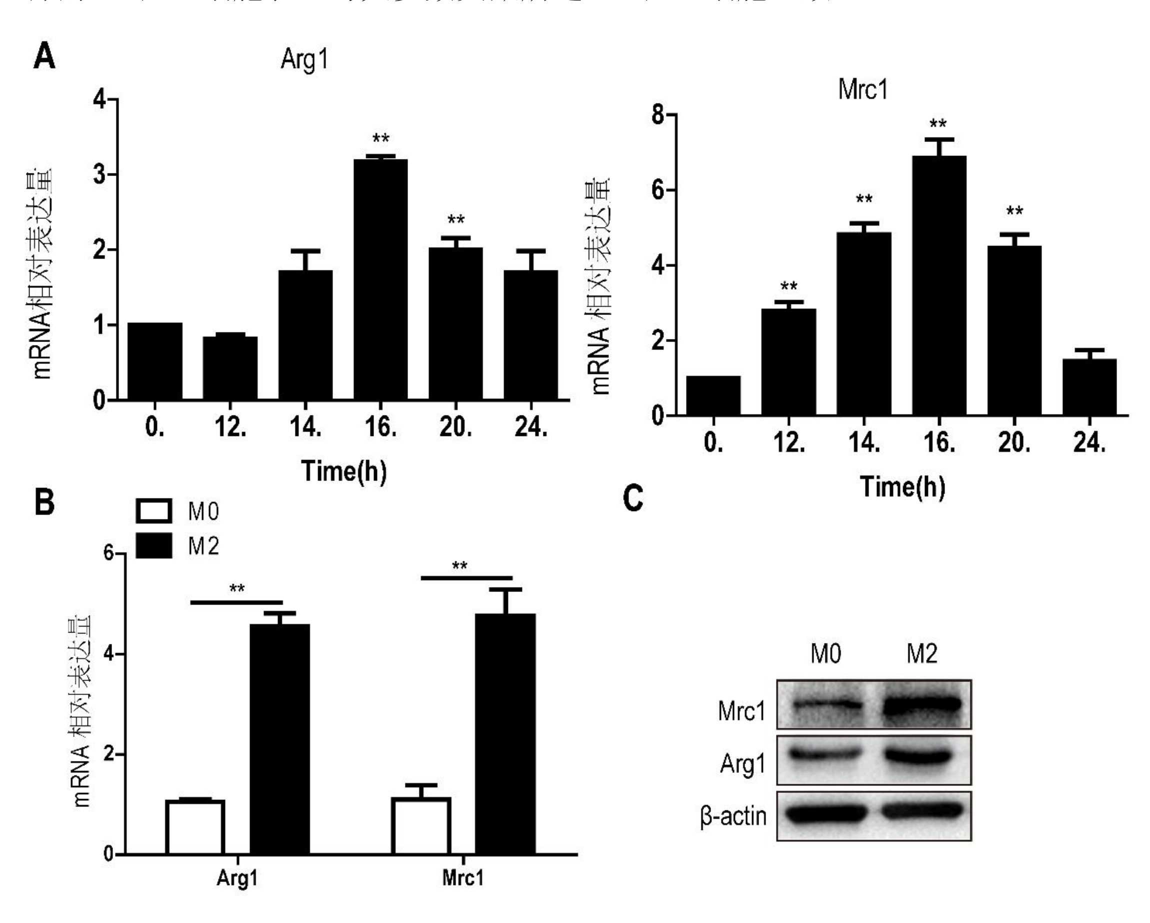
1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 统计学软件进行数据分析，采用单因素变量方差分析或 t 检验，所有的实验至少独立重复 3 次，P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP1-M2 巨噬细胞模型构建及验证

利用 IL-4 诱导 THP1-M0 构建 M2 巨噬细胞模型，以 M2 特异表面标志物 Arg1 和 Mrc1 为表型特征验证细胞模型构建成功。与 M0 组相比，M2 细胞在 mRNA 水平和蛋白水平高表达 Arg1 和 Mrc1（ P ＜0. 01）（图 1A，B）。综上，THP1 来源的 M2 巨噬细胞表型与大多数文献所述 M2 巨噬细胞一致。



A.用 20ng/ml IL-4 刺激 THP1-M0 细胞不同时间，实时定量 PCR 检测 M2 相关因子 Arg1 和 Mrc1 的表达；B.用 20ng/ml IL-4 或 5% BSA 刺激 THP1-M0 细胞 16 小时后，实时定量 PCR 检测 M2 相关因子 Arg1 和 Mrc1 的表达；C. 用 20ng/ml IL-4 刺激 THP1-M016 小时后，免疫蛋白印迹法检测 M2 相关因子 Arg1 和 Mrc1 的蛋白水平。*P ＜ 0. 05，**P ＜ 0. 01。

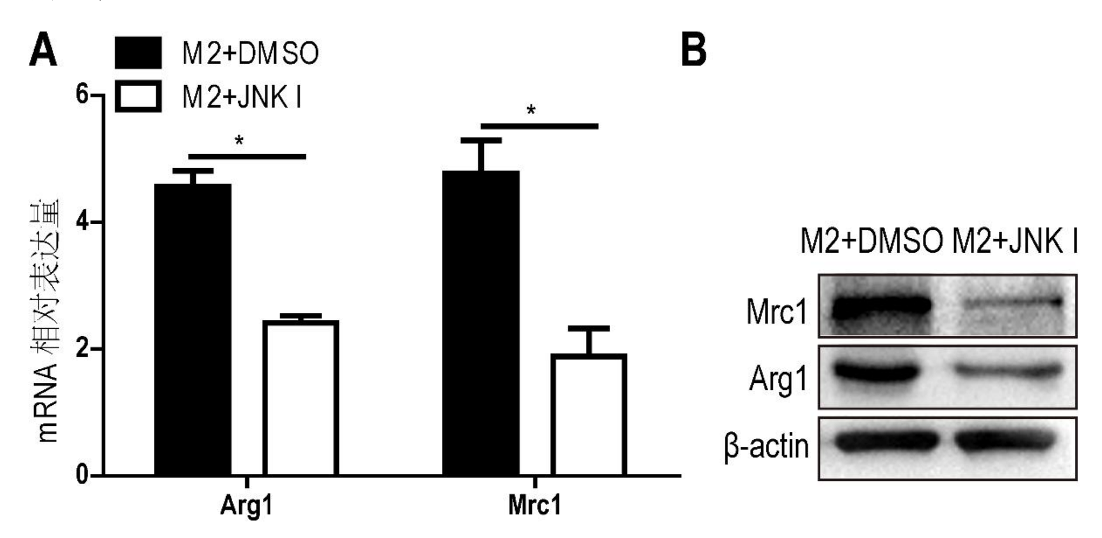
A. THP1-M0 cells were stimulated with IL-4 (20 ng/mL) for 12, 14, 16, 20 and 24 h. The expression of M2-associated genes, including Arg1, Mrc1 was evaluated by qPCR; B. Stimulated with IL-4 or 5% BSA on M0 for 16 hours, and the expression of M2 associated cytokine genes Arg1 and Mrc1 were analyzed with qPCR; C. Stimulated with IL-4 on M0 for 16 hours, Arg1 and Mrc1 protein levels were analyzed with western blot. *P ＜ 0. 05，**P ＜ 0. 01.

图 1 THP1-M2 巨噬细胞表面标志物表达情况

Fig 1 Expression of M2 associated markers in THP1-M2

2.2 阻断 JNK 通路抑制 THP1-M2 极化程度

为了研究 JNK 通路是否参与 IL-4 诱导的 THP-1-M2 极化过程，我们使用 JNK 通路特异性抑制剂阻断其作用。与对照组相比，无论在 mRNA 水平还是蛋白水平上，阻断 JNK 通路的实验组 Arg-1 和 Mrc-1 的表达均明显下降(P ＜0. 01)（图 2A，B）。综上，JNK 通路参与调控 IL-4 诱导的 THP-1 从 M0 型向 M2 型极化的过程。



A.向 THP1-M0 细胞中加入 JNK I 或 DMSO 处理 60min 后，IL-4 刺激 16h 后，实时定量 PCR 检测 Arg1 和 Mrc1 的表达；B. 免疫蛋白印迹法检测 Arg1 和 Mrc1 的蛋白水平。*P ＜ 0. 05，**P ＜ 0. 01。

A.THP1-M0 macrophages were treated with JNK-inhibitor I (JNK-I, 20 μM) or DMSO for 60 min, followed by stimulation with IL-4 for 16 h. Arg1, Mrc1 expression was determined by quantitative PCR; B. Protein levels of Arg1, Mrc1 were evaluated by Western blot. Band intensity of Western blots was analyzed by densitometry, and normalized to β-actin level. *p ＜ 0.05, **p ＜ 0.01.

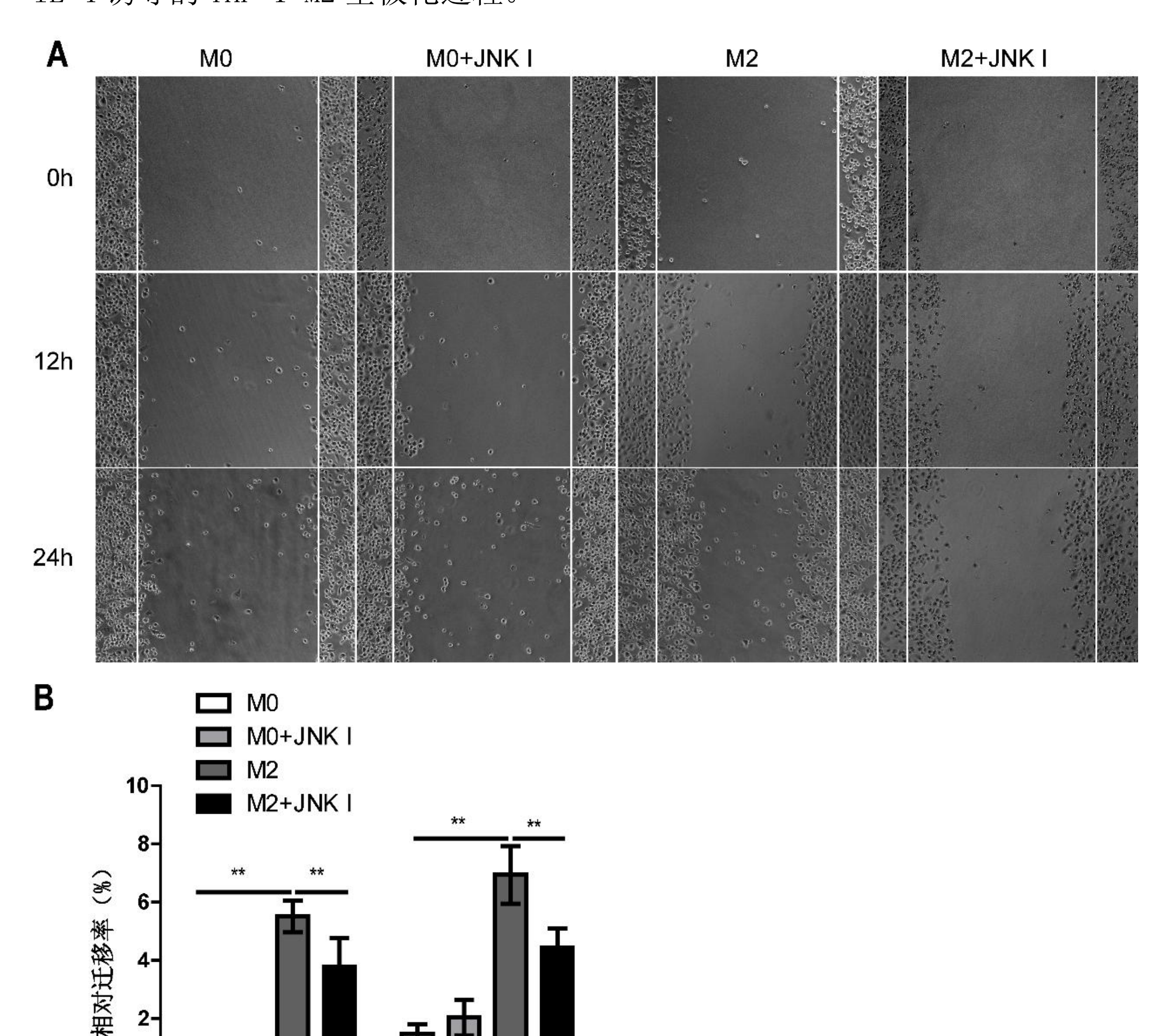
图 2 JNK I 对 THP1-M2 巨噬细胞极化状态的影响

Fig2 Effects of JNK I IRF1on the polarization of on THP1-M2

2.3 阻断 JNK 通路抑制 THP1-M2 的细胞迁移能力

随后，我们使用 JNK 通路特异性抑制剂处理 THP-1-M2 后，应用细胞划痕实验检测其迁移能力，以探究 JNK 通路是否影响 THP-1-M2 的细胞迁移能力。我们发现，与 M0 组相比，M2 组细胞迁移能力明显增强，而阻断 JNK 通路可部分削弱

其迁移能力（图 3A，B）。综上，实验数据进一步证明，JNK 通路确实参与调控 IL-4 诱导的 THP-1-M2 型极化过程。



A，B. 细胞划痕试验检测巨噬细胞迁移能力。将 THP1 加入 IL-4 处理的时刻记为 0h，分别在 0，12，24h 进行拍照，每组拍摄 9 个区域。*p ＜ 0.05，**p ＜ 0.01.

A. Cell migration of THP1 cells was measured via wound healing. The width of wound area was calculated at three time points (0, 12, 24 h) starting from the point when THP-1 cells were treated with IL-4; B. The quantification of wound healing percentage (100%) was exhibited with the error bars representing mean ± SD of three independent experiments. *p ＜ 0.05, **p ＜ 0.01.

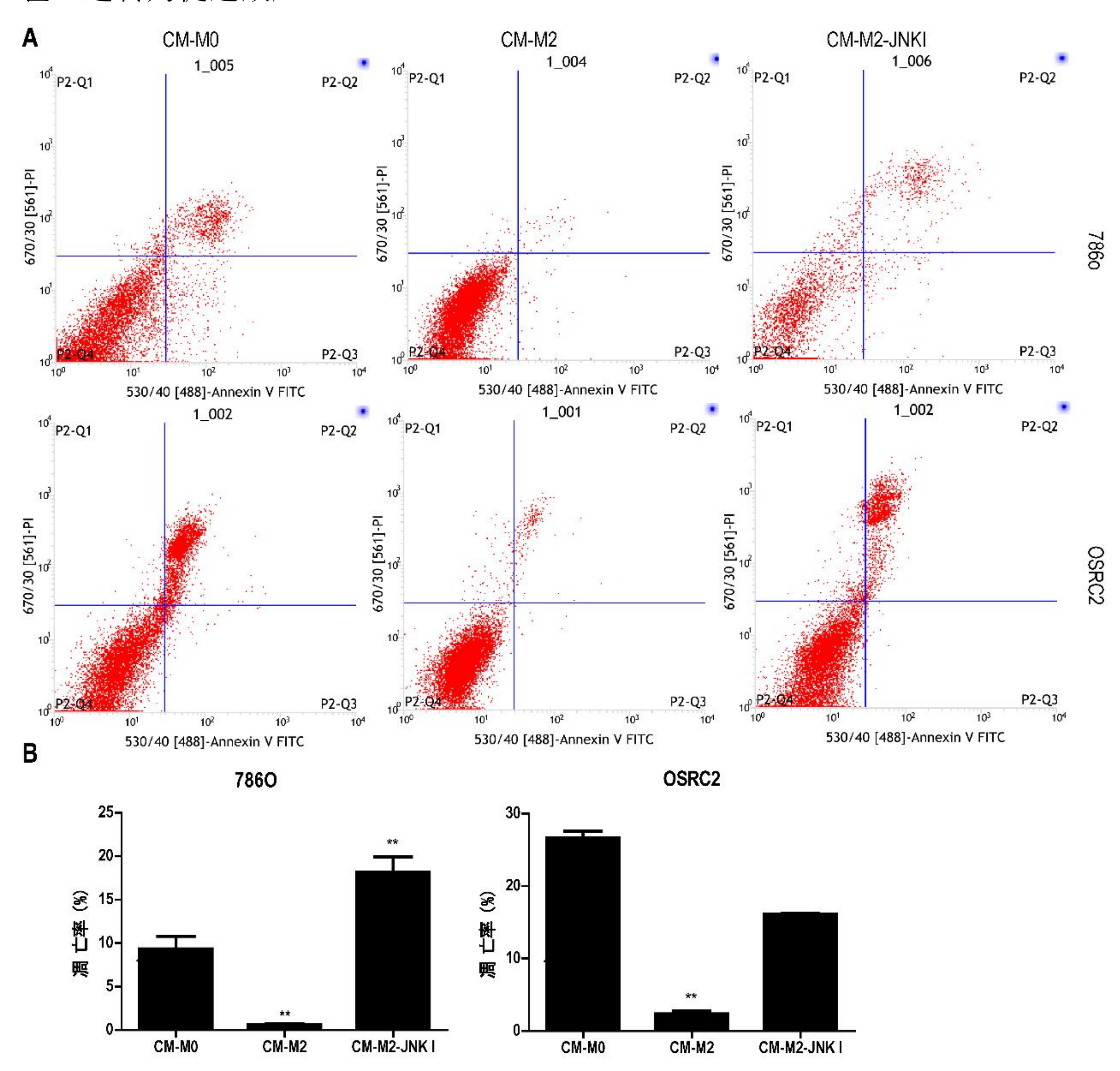
图 3 JNK I 对 THP1-M2 巨噬细胞极化状态的影响

Fig3 Silencing of JNK pathway inhibits THP1-M2 cells migration

2.4 阻断 JNK 通路抑制 M2 促肾癌肿瘤细胞的凋亡

条件培养基（CM）培养 7860 和 OSRC2 后，用流式法检测各组 CM 对肾癌细胞凋亡能力的影响。与对照组相比，CM-M2 组 7860 和 OSRC2 肾癌细胞的凋亡能力

显著下降。而与 CM-M2 组相比，CM-M2-JNKI 组 7860 和 OSRC2 细胞凋亡能力明显回升（图 4A，B）。甚至对于 7860 肾癌细胞，M2 细胞对其凋亡能力从抑制变为促进。提示，阻断 JNK 通路后，M2 型巨噬细胞对肾癌细胞凋亡的抑制效应减弱，甚至逆转为促进效应。



A.B. 流式细胞术检测 3 组 CMs 对人肾癌细胞系凋亡能力的影响，以 CM-M0 组为对照组。细胞凋亡率=早期早期凋亡+晚期凋亡（Q2+Q3）。*p ＜ 0.05，**p ＜ 0.01。

A.The numbers in parentheses represented early apoptotic rate and late apoptotic rate (quadrant 2 plus quadrant 3); B. histograms showed apoptotic rate of 7860 and OSRC2 cultured with CMs;*p ＜ 0.05, **p ＜ 0.01.

图 4 流式细胞术检测不同条件培养基对肾癌细胞凋亡的影响

Fig 4 Effects of conditioned medium on apoptosis of renal cell carcinoma analyzed by flow cytometry

3 讨论

肿瘤细胞发展从细胞凋亡的角度解析，可以认为是肿瘤细胞的凋亡机制受到抑制，不能正常进行细胞死亡清除，从而导致肿瘤细胞生长失控。JNK 通路时 MARK

通路中至关重要的一条，参与调控多种细胞的增殖、凋亡和分化，在免疫反应和肿瘤疾病中不可或缺[12-14]。因而在肿瘤的发生发展中弄清其作用机制显然很有必要。此外，许多研究报道肿瘤微环境存在大量巨噬细胞浸润，且其大多是发挥免疫抑制效应的 M2 型巨噬细胞，抑制了肿瘤细胞的凋亡同时促进肿瘤细胞的增殖[15-17]。我们在之前研究发现 JNK 通路参与调控了鼠源巨噬细胞 M2 型极化[9]，但其在人源巨噬细胞 M2 型极化和极化介导的肿瘤效应中的作用并不清楚。本实验为研究 JNK 通路对 M2 巨噬细胞极化及其促癌作用的影响，构建了 M2 巨噬细胞模型，经表型鉴定得到该 M2 模型高表达 Arg1，Mrc1，这与之前文献报道一致。与以上报道相似，本实验发现，在 THP1 细胞来源的巨噬细胞中，替代激活型 THP1-M2 细胞较未活化型 THP1-M0 细胞高表达 M2 型巨噬细胞主要标志物 Arg1，Mrc1。阻断 JNK 通路后， Arg1 和 Mrc1 表达显著降低。

在肿瘤免疫方面，M2 型巨噬细胞有促进肿瘤发生发展的作用，而 M1 型巨噬细胞则有抗肿瘤的作用[18, 19]。为研究 JNK 通路对 M2 型巨噬细胞介导的促癌作用的影响，本实验采用条件培养的方法：即收集阻断或未阻断 JNK 通路的 THP1-M2 细胞上清作为 CM，用 CM 分别培养肾癌细胞后，检测其对肾癌细胞凋亡的影响。其中，条件培养属于非直接接触式培养，是细胞共培养模型中的一种[20]。与直接接触式培养相比，条件培养的优点在于克服了 2 种细胞分离、观察和后续功能检测等方面的限制。除此以外，M2 型巨噬细胞的建立是通过诱导剂处理单核细胞至少 40 h，考虑到各诱导剂长时间作用对细胞的毒性作用可能导致 M2 型巨噬细胞状态较差，所以在观察肾癌细胞的功能试验中采取条件培养的方法。与文献报道一致，THP1-M2 巨噬细胞表现出明显的抑制肾癌细胞凋亡的能力；反之，阻断 JNK 通路后其抗肾癌细胞凋亡的能力明显减弱。提示 JNK 通路在 M2 型巨噬细胞介导的肿瘤效应中发挥着重要作用。

综上所述，JNK 通路参与调控 M2 型巨噬细胞极化状态，并在 M2 型巨噬细胞肿瘤效应中发挥着重要作用，为以巨噬细胞极化为靶点的肿瘤免疫治疗提供了实验基础。但 JNK 通路调控 M2 型巨噬细胞极化的机制还有待进一步研究阐明。

参考文献:

[1] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. Journal of Clinical Investigation, 2006, 108(2): 408-409

[2] Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. Nature Reviews

Cardiology, 2015, 12(1): 10
[3] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature, 2013, 496(7446): 445-455
[4] Zheng XF, Hong YX, Feng GJ, et al. Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by Candida albicans mediated up-regulation of EBI3 expression. PloS one, 2013, 8(5): e63967
[5] Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annual review of immunology, 2009, 27(1): 451-483
[6] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nature reviews Immunology, 2011, 11(11): 723-737
[7] Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, et al. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. Blood, 2003, 102(3): 1078-1086
[8] Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000, 105(6): 1063-1070
[9] Hao J, Hu Y, Li Y, et al. Involvement of JNK signaling in IL4-induced M2 macrophage polarization. Experimental Cell Research, 2017, 357(2): 155-162
[10] Zhou Y, Zhang T, Wang X, et al. Curcumin Modulates Macrophage Polarization Through the Inhibition of the Toll-Like Receptor 4 Expression and its Signaling Pathways. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2015, 36(2): 631-641
[11] Martinez FO, Helming L, Milde R, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. Blood, 2013, 121(9): e57-69
[12] Zou J, Shankar N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF-kappaB Signaling Pathways in the Regulation of Phagocytosis and Proinflammatory Cytokine Expression in Response to E. faecalis Infection. PloS one, 2015, 10(8): e0136947
[13] Xiong CY, Guan DW, Liu ZH, et al. [Changes of phospho-JNK expression during the skin burned wound healing]. Journal of Forensic Medicine, 2008, 24(5): 325-335
[14] Gnanaprakasam JN, Estrada-Muniz E, Vega L. The anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces macrophage activation via the phosphorylation of ERK1/2, JNK, P38 kinases and NF-kappaB. International immunopharmacology, 2015, 29(2): 808-817
[15] Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(5): 1155-1166
[16] Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, et al. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. Carcinogenesis, 2011, 32(9): 1333-1339
[17] Swartz MA, Iida N, Roberts EW, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. Cancer Research, 2012, 72(10): 2473
[18] Smit-Peter SY. The role of cytokine in regulation of the natural killer cell activity. Srp Arh Celok Lek, 2008, 136(7): 423-429
[19] Engel MA, Neurath MF. Anticancer properties of the IL-12 family--focus on colorectal cancer. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(29): 3303
[20] Hanlon AM, Jang S, Salgame P. Signaling from cytokine receptors that affect Th1 responses. Frontiers in Bioscience A Journal & Virtual Library, 2002, 7(7): d1247